

Antigène lipopolyosidique de *Pasteurella multocida* type E

par P. PERREAU et J.-P. PETIT

avec la collaboration technique de M^{me} D. BERGERON, M^{lle} P. GAYT et de M^{me} A. MARQUET

L'existence d'un type sérologique de *Pasteurella multocida*, agent de la pasteurellose septicémique des bovins africains et distinct des quatre types classiques connus jusqu'ici, vient d'être établi récemment (4, 11).

La septicémie pasteurellique observée sur le bétail d'Afrique centrale et occidentale ne se distingue de la septicémie classique due au type B, observée surtout en Asie, par aucun signe particulier tant du point de vue clinique que nécropsique.

Nous avons déjà montré que la distinction antigénique peut être faite entre les souches de type B et les souches africaines au moyen de trois méthodes : hémagglutination passive, séro-protection de la souris et précipitation en gélose (11).

Nous avons utilisé dans ces tests des antigènes bruts, préparés à partir de bactéries entières traitées par la chaleur, les ultra-sons, ou des alternances de congélation et de décongélation.

Désirant approfondir et confirmer la spécificité sérologique du type africain, nous avons isolé les antigènes lipopolyosidiques des souches d'Afrique centrale afin de les comparer à ceux des souches du type B.

L'étude des lipopolyosides de *Pasteurella multocida* a déjà fait l'objet de divers travaux, et certains sont anciens, qui méritent d'être rappelés ici.

PIROSKY (12, 13, 14) en 1938, utilisant la méthode de BOIVIN et MESROBEANU, avait isolé un complexe glucido-lipidique auquel il avait reconnu une spécificité sérologique ainsi que des propriétés toxiques et immunisantes.

CARTER et ANNAU (5) en 1953 ont préparé des polyosides capsulaires à haute spécificité sérologique, qu'ils ont distingués de l'« antigène de Boivin », ce qui était sans doute inexact, car, à la lumière des données actuelles, leurs extraits devaient contenir aussi des lipopolyosides de surface.

MAC LENNAN et RONDLE (9) en 1957 ont extrait par le phénol des lipopolyosides pyrogènes dont la spécificité sérologique était mise très nettement en évidence par des tests de précipitation en gélose utilisant des sérums absorbés par des antigènes communs. Étant donné que cette spécificité était exactement parallèle à la spécificité immunologique révélée par les épreuves de séroprotection des souris, ils pensaient que ces antigènes devaient être protecteurs, sans pouvoir l'affirmer d'ailleurs car d'autres antigènes spécifiques et protecteurs pouvaient exister dans la bactérie.

BAIN et KNOX (2) en 1961 font une étude détaillée des antigènes glucido-lipidiques de *Pasteurella multocida* type I (souche INSEIN), montrent leur toxicité et leur rôle important dans le phénomène d'hémagglutination passive et analysent leur constitution chimique par chromatographie.

La présente étude poursuit le même but que ce dernier travail en s'adressant à un type sérologique distinct, bien que voisin, de *Pasteurella multocida* ; nous pensons, en effet, qu'il est d'un grand intérêt d'assurer sur le plan de la chimie biologique et de l'immunologie la différence qui peut exister entre les deux types bactériens qui sont responsables de la septicémie hémorragique des bovins.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches de « *Pasteurella multocida* » :

Les souches de type E sont les souches P7, P11 et P13, isolées en Adamaoua (Cameroun). La dernière a été récoltée en septembre 1962 et a servi à la production de lipopolyoside spécifique dès son isolement.

Comme souches de type B, nous avons employé pour comparaison, la souche Insein de Birmanie, et secondairement la souche R2 d'Iran.

Préparation des antigènes lipopolyosidiques :

1^o Obtention des suspensions bactériennes.

Des suspensions denses de *Pasteurella multocida* sont récoltées dans un appareil à culture aérée et agitée par tourbillon (10) ; le milieu est celui de STERNE et l'antimousse est le Rhodorsil 426 Rhône-Poulenc.

Les récoltes sont centrifugées à 15.000 t./mn dans une centrifugeuse Servall à dispositif de débit continu (SZENT-GORGYI). Cette centrifugation permet l'élimination totale de l'antimousse et l'obtention de culots microbiens très essorés.

Les germes sont repris par un faible volume d'eau distillée, de façon à obtenir une suspension très dense : en moyenne, 20 g de bactéries sèches pour un litre d'eau.

Cette suspension est homogénéisée soigneusement à l'aide d'un appareil « Ultra-Turrax » TP 18/2.

2^o Préparation des lipopolyosides.

La méthode employée est celle de WESTPHAL (18, 19) ; la suspension est traitée par un égal volume d'une solution de phénol à 90 p. 100 à chaud (une demi-heure à 65-68° C), l'homogénéisation du mélange phénol-suspension étant effectuée aussi à l'Ultra-Turrax.

Ce mélange, refroidi immédiatement, est conservé une nuit à 4° ; la couche aqueuse de surface, décantée, subit deux centrifugations étagées pour être débarrassée de tout élément figuré.

Cette phase aqueuse est mise en dialyse continue (3 à 4 jours) jusqu'à ce qu'on ne puisse plus y déceler de phénol ; elle est ensuite concentrée et lyophilisée. On obtient alors un produit brut,

riche en acide nucléique, que l'on peut conserver longtemps sans altérations ou purifier immédiatement.

Cette purification est faite d'abord par précipitation à l'alcool à 95° (15 p. 100 en volume), après remise de l'antigène en solution dans de l'eau distillée. Deux précipitations successives sont effectuées ; les culots sont rejetés et le surnageant seul est conservé. C'est un liquide à opalescence bleu-jaune, légèrement visqueux et qui ne mouille pas le verre.

La dernière purification est faite par centrifugation : après 4 heures à 37.000 g (centrifugeuse Servall RC-2, Rotor SS 34), le lipopolyoside apparaît au fond des pots sous forme d'un disque blanc et visqueux. Ce sédiment, après rejet du surnageant, est remis en solution dans de l'eau distillée et centrifugé une seconde fois dans des conditions identiques.

Le lipopolyoside purifié obtenu est lyophilisé.

Méthodes de dosage :

Ces échantillons lyophilisés ont servi à préparer des solutions aqueuses contenant toutes 1,0 mg/ml du produit isolé.

Sur ces solutions, l'azote a été dosé selon la méthode de KJELDAHL après minéralisation sulfurique et oxydante (H_2O_2), le phosphore acidosoluble total par la technique spectrophotométrique de DELSAL et MANHOURI (7) modifiée pour permettre le dosage de 0,5 µg dans 10 ml en effectuant la lecture à 830 mµ.

Les protéines ont été déterminées par la méthode du biuret selon ARDRY (1), mais cette excellente méthode n'était pas assez précise pour les très faibles quantités que nous avions à doser. Aussi l'avons nous complétée par l'établissement du spectre ultraviolet de 230 à 390 mµ et par la détermination des rapports des coefficients d'extinction : $\frac{K_{280}}{K_{310}}$ et $\frac{K_{280}}{K_{252}}$; la solution

témoin était un sérum de bovin dilué contenant 3,373 mg de protéines par ml.

De la même façon les dosages d'acide ribonucléique à 260 mµ ont été complétés par la détermination des rapports des coefficients d'extinction $\frac{K_{260}}{K_{310}}$ et $\frac{K_{260}}{K_{230}}$; le témoin était une solution d'acide ribonucléique Fluka « purum ».

Toutes ces déterminations et ces dosages

spectrophotométriques ont été faits avec un appareil Zeiss PMQ-II, les mesures de pH avec le potentiomètre Metrohm E 353.

Les concentrations sous vide intervenant après chaque précipitation alcoolique ont été faites sans que la solution traitée dépasse la température de 60° C dans un Rotovapor Buchi.

Méthodes sérologiques :

L'hémagglutination indirecte est faite selon la méthode de CARTER (3) en utilisant soit des hématies O humaines fraîches, soit des hématies de mouton fraîches ou formolées, en suspension à 1 p. 100 et sensibilisées par des solutions de concentrations diverses en lipopolyside ; elle est effectuée en tubes et non sur plaque.

La précipitation en gélose utilise le milieu suivant ajusté à pH 7.

gélose noble Difco	12 g
chlorure de sodium	8,5 g
merthiolate de Na	0,1 g
eau distillée	1.000 ml

L'immunoélectrophorèse a été pratiquée en gélose noble Difco à 1 p. 100, tamponnée au véronal sodique (pH 8,20, force ionique: 0,05), selon la méthode de GRABAR et WILLIAM (8), mais sur des lames porte-objet (microanalyse de SCHEIDEGGER (15) ; Le mélange tampon-gélose (à parties égales) est étalé sur les lames en couche uniforme de 3 mm d'épaisseur ; celles-ci sont soumises ensuite, dans une cuve (Chaix) permettant une évaporation contrôlée, à une tension de 9,4 V/cm pendant 50 mn.

Les protéines sont alors caractérisées à l'amidoschwartz et les glyco-protéines et polysides par la réaction à l'acide périodique de SCHIFF adaptée par URIEL (17) à l'analyse immunoélectrophorétique.

RÉSULTATS

A. — Composition du produit isolé.

Le rendement de cette méthode d'extraction est d'environ 3 p. 100 par rapport au poids initial de bactéries sèches (lyophilisées).

La poudre blanche obtenue par lyophilisation est extrêmement pulvérulente ; on la remet

facilement en solution dans l'eau, à moins qu'elle n'ait subi des lyophilisations successives, ce qui altère grandement sa solubilité.

L'analyse des phosphates qu'elle contient, faite en deux temps, permet de séparer les phosphates acido-solubles, dosables directement sans hydrolyse ni minéralisation préalable (orthophosphates et esters phosphorylés très labiles tels que ribose-1-phosphates, etc.) des phosphates acidosolubles totaux.

La composition élémentaire de cet antigène purifié est résumée dans les chiffres suivants qui sont des pourcentages en poids et sont exprimés en phosphore minéral pour les phosphates :

Azote total.	Phosphore 0 mn.*	Phosphore acidos. total.	Protéine.	A. R. N.
—	—	—	—	—
2,7 p. 100	1,3 p. 100	3,6 p. 100	0 p. 100	0 p. 100

L'absence de protéines et d'acide ribonucléique est confirmée par l'aspect du spectre dans l'ultraviolet d'une solution aqueuse de l'antigène (1 mg/ml, pH 7,48), comparé à celui du surnageant de la dernière centrifugation préparative (fig. 1.).

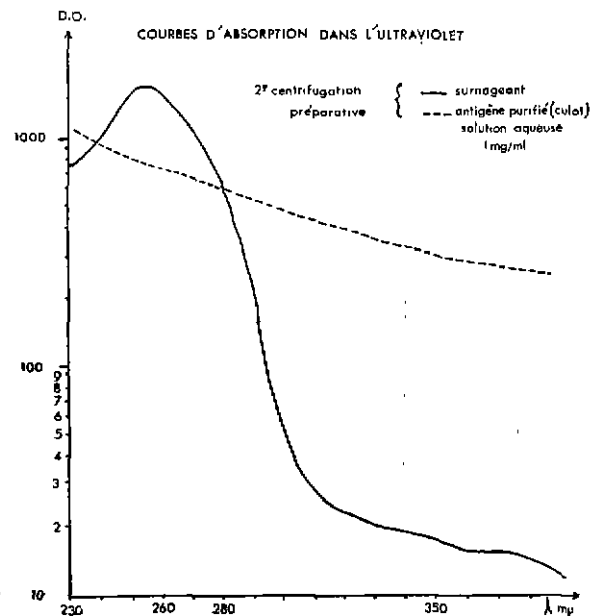


Fig. 1

* Phosphates dosables immédiatement avant l'hydrolyse ou la minéralisation.

Pour l'acide ribonucléique on a :

$$\frac{K\ 260}{K\ 310} = \frac{1190}{35} = 48,28 \text{ et } \frac{K\ 260}{K\ 230} = \frac{1690}{760} = 2,22$$

tandis que pour l'antigène : $\frac{K\ 260}{K\ 310} = 1,68$ et

$$\frac{K\ 260}{K\ 230} = 0,67$$

On peut d'abord conclure à l'absence de protéines contenant de la tyrosine, du tryptophane ou de la phényl-alanine, puisqu'aucun pic n'est visible à 280 mμ. En effet, on a pour la solution protéique témoin diluée 8 fois :

$$\frac{K\ 280}{K\ 310} = 26,85 \text{ et } \frac{K\ 280}{K\ 250} = 2,21, \text{ tandis que}$$

pour l'antigène on a : $\frac{K\ 280}{K\ 310} = 1,38$ et $\frac{K\ 280}{K\ 250} = 0,75$

D'autre part, la réaction du biuret perfectionnée par ARDRY étant négative, on peut admettre, de façon définitive, l'absence de protéines, absence qui, jointe à celle de l'acide ribonucléique, nous permet de penser que nous sommes en face d'un lipopolyoside purifié.

B. — Analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique

Les électrophorèses simples préliminaires nous ont confirmé l'absence de protéines décelables par nos méthodes d'analyse tandis que la caractérisation des glucides nous permettait de mesurer la mobilité du composé glucidique

principal de l'extrait relative à la sérum albumine humaine, soit : + 0,28.

L'immunoélectrophorèse permet de différencier quatre arcs (fig. 2), dont deux sont très nets (lignes 1 et 2) ; les deux autres sont plutôt des bandes de précipitation, d'apparition tardive, correspondant vraisemblablement à des fractions mineures de faible concentration (lignes 3 et 4).

C. — Propriétés biologiques

1) Chez le lapin (les animaux utilisés pèsent 2 kg).

Le pouvoir pyrogène est très net ; on observe régulièrement un pic thermique situé entre la deuxième heure et la quatrième heure qui suivent l'injection intraveineuse de lipopolyoside (voir fig. 3).

L'écart de température observé est d'au moins 2° C pour toutes les doses comprises entre 25 μg et 0,05 μg. Il est encore de 1° 4 pour une dose de 0,005 μg.

On peut observer que des lapins immuns (ayant reçu la veille du sérum très riche en anticorps) font la même réponse fébrile, que le sérum soit homologue ou hétérologue par rapport au type de l'endotoxine injectée. Bien plus, il s'y ajoute une réponse fébrile propre à l'injection de sérum de telle sorte que les lapins « protégés » font une réaction thermique plus élevée que celle des lapins normaux. Sans doute retrouve-t-on là le pouvoir pyrogène des extraits leucocytaires que contiennent fréquemment les sérums.

L'action sur les leucocytes est également très nette, comme le montre la figure 4. La leucopénie

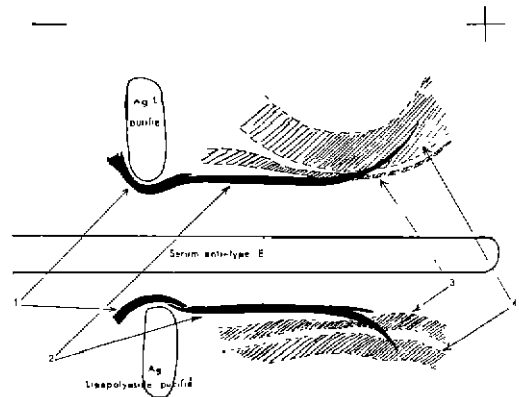
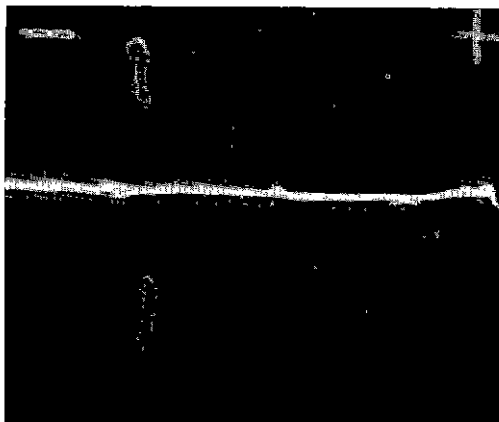


Fig. 2. — Analyse immunoélectrophorétique de l'antigène lipopolyosidique purifié du type E.

s'installe brutalement dans les minutes qui suivent l'injection et dure de 3 à 6 heures ; elle est suivie d'une hyperleucocytose temporaire atteignant 25 à 30.000 leucocytes par ml en moyenne.

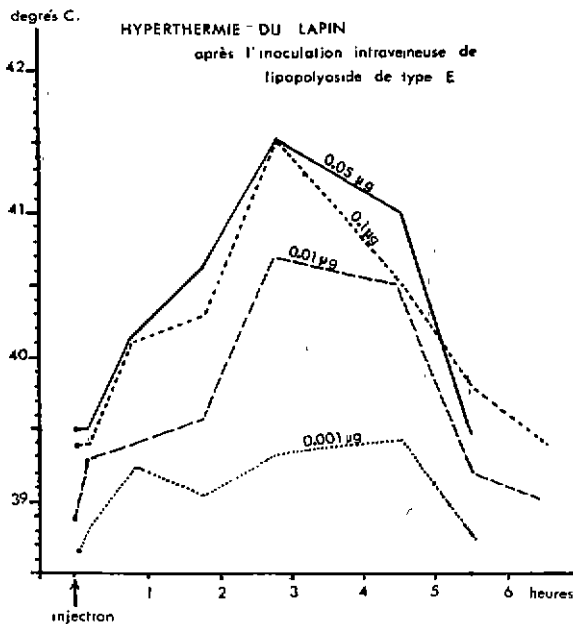


Fig. 3

Outre cette double action sur la température centrale et le nombre des leucocytes du sang, le lipopolysaccharide provoque, par voie intraveineuse et pour des doses d'au moins 5 µg, un syndrome toxique constitué par :

— une crise respiratoire grave qui s'installe très vite après l'injection ; elle peut aller de la

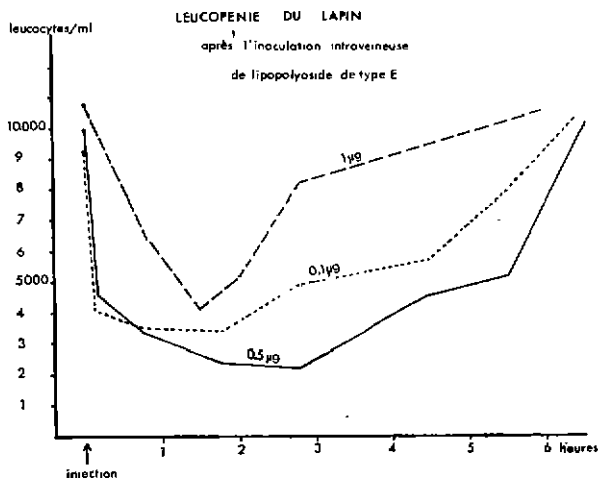


Fig. 4

simple polypnée à une dyspnée profonde avec tirage inspiratoire et discordance. Elle peut aussi être mortelle et l'issue fatale survenir en 1 ou 2 heures ; nous avons là les effets de la « toxine respiratoire » de *Pasteurella multocida* qu'avait signalée STAMATIN (16).

— des plaintes spontanées, des cris qui peuvent accompagner cette crise.

— de la diarrhée qui apparaît chez 50 p. 100 des lapins inoculés, souvent 15 mn après l'injection.

— un état de prostration typique fréquent, mais non obligatoire.

— des troubles vasculaires identiques à ceux observés classiquement avec les endotoxines des entérobactéries. Des phénomènes de vasoconstriction périphérique sont très visibles sur le réseau vasculaire de l'oreille du lapin ; quelques minutes après l'injection intraveineuse, les vaisseaux superficiels subissent deux ou trois variations cycliques de diamètre, une vasodilatation succédant à une vasoconstriction et chaque cycle durant 1 à 2 mn.

Ces troubles engendrent assez vite un état d'ischémie superficielle qui dure pendant toute l'évolution de l'intoxication et il devient très difficile de faire saigner la peau ou de prélever du sang à la veine marginale de l'oreille.

La dose sûrement mortelle pour le lapin peut être difficilement évaluée, car il semble qu'il y ait des différences très nettes de résistance individuelle. Des animaux ont succombé très vite à une dose de 50 µg, d'autres ont résisté à une dose de 250 µg ; il faut une dose d'au moins 500 µg pour que les lapins aient un risque important de mourir, mais des sujets y résistent encore.

Les lésions macroscopiques observées sur les lapins tués par l'endotoxine pasteurellique sont essentiellement :

— des lésions très nettes d'emphysème du poumon et une congestion de la muqueuse de l'arbre trachéo-bronchique.

— une dégénérescence graisseuse marquée du foie.

— des pétéchies sur le thymus.

— une congestion discrète des plaques de Peyer.

— une congestion du tractus génital femelle (ovaires et cornes utérines surtout).

— une légère splénomégalie.

2) Chez la souris :

L'injection intrapéritonéale d'endotoxine entraîne de façon constante l'établissement d'une prostration accompagnée d'hypothermie et de diarrhée, ce qui reconstitue le tableau clinique observé chez les souris qui servent aux épreuves de séroprotection et qui sont protégées insuffisamment ou pas du tout ; le retour à l'état normal survient au bout de 3 à 4 jours.

L'appréciation de la dose mortelle pour la souris se heurte aux mêmes difficultés que chez le lapin, d'autant plus que celle-ci résiste fréquemment à des doses, considérables pour un tel animal, de 1 mg.

Les lésions les plus caractéristiques sont la dégénérescence graisseuse du foie et la splénomégalie.

3) Chez le zébu :

Nous avons injecté le lipopolyoside par voie intraveineuse à six jeunes zébus (de race arabe du Tchad) âgés de un an à dix huit mois et pesant de 100 à 140 kg.

La préparation de lipopolyoside qui nous a servi dans cette expérience n'était que peu purifiée et contenait encore de l'acide ribonucléique.

Les doses utilisées furent : 500 µg, 1 mg, 2 mg et 3 mg.

D'une façon générale, les réactions n'ont pas eu l'intensité que l'on espérait ; la réponse la plus nette a été constituée par la leucopénie consécutive à l'injection intraveineuse (voir le tableau n° 1).

Plus de réaction d'hyperthermie marquée ;

pour une dose de 500 µg, l'écart de température a atteint au maximum 1°2 et encore faudrait-il tenir compte de la montée habituelle de la température centrale pendant les heures chaudes de la journée.

Pour les doses de 1,2 et 3 mg, l'effet le plus inattendu fut une réaction d'hypothermie (voir fig. 5) qui coïncidait avec un syndrome toxique net.

La nature de la réponse thermique dépendrait-elle de la dose d'endotoxine injectée ? Nous avons fait trop peu d'essais pour pouvoir l'affirmer.

Les animaux se tenaient prostrés, le mufle au ras du sol ; polypnée, ptialisme abondant, émissions fréquentes d'excréments ramollis, plainte spontanée expiratoire constituaient les signes les plus nets.

Tout rentra dans l'ordre en quelques heures et le lendemain les animaux étaient parfaitement normaux.

D. — Propriétés antigéniques

1. — *In vitro* :

a) Hémagglutination indirecte :

Cet antigène purifié possède une grande affinité pour la surface des hématies humaines O et des hématies de mouton, qu'elles soient fraîches ou formolées et il devient donc facile d'effectuer des tests d'hémagglutination indirecte, réactions dont la spécificité devient excellente.

CARTER (6) vient d'ailleurs de montrer l'intérêt que pouvait avoir l'emploi des lipopo-

Tableau n° I

Chute du nombre des leucocytes après l'injection intraveineuse
de lipopolyoside E chez les jeunes zébus.

	N° des animaux					
	697	699	969	SN	698	889
Dose de lipopolyoside E	500 µg	500 µg	1 mg	1 mg	2 mg	3 mg
Leucocytes / ml						
1) nombre initial :	12000	12800	12000	5600	9000	9400
2) nombre minimum observé :	4000	3200	1200	1000	3400	2800

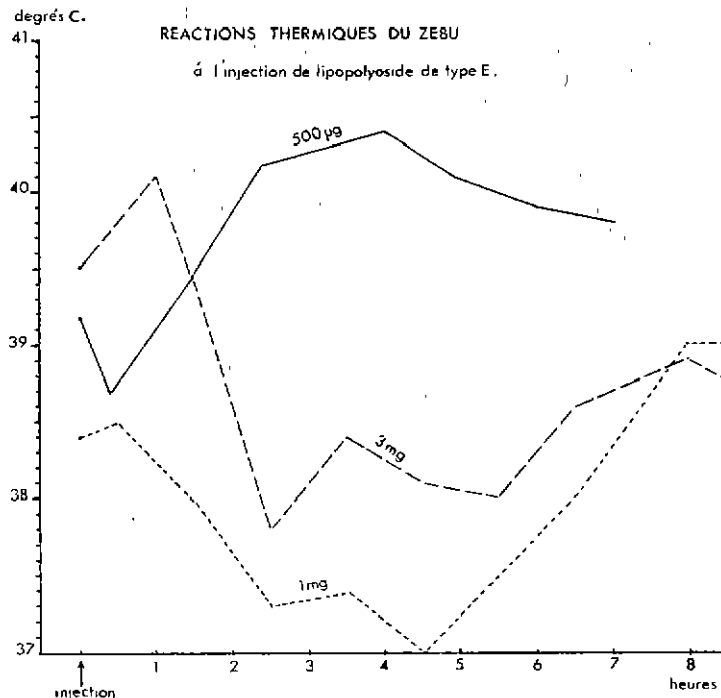


Fig. 5

lyosides spécifiques des types A, B et D de *Pasteurella multocida* dans l'étude immunologique des pasteurelloses ; nos expériences confirment ces travaux et les complètent avec le type E africain.

Les tableaux suivants (n° II et n° III) montrent les quantités de lipopolyoside nécessaires pour sensibiliser correctement la surface des hématies

et cela de façon comparative pour le type B et le type E.

On y voit que, pour les deux antigènes purifiés, des quantités de 2,5 à 10 µg sont suffisantes pour saturer efficacement la surface des hématies contenues dans 0,1 ml de culot normal de centrifugation, soit la quantité d'hématies permettant d'obtenir 10 ml de suspension à 1 pour cent.

Tableau n° II

Réaction d'hémagglutination passive avec le lipopolyoside purifié de type E (souche P 13)

Quantités de lipopolyoside*	Dilutions du sérum								
	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480
50 µg	+	+	+	+	+	+	+	-	-
25 µg	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10 µg	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5 µg	+	+	+	+	+	+	+	+	±
2,5 µg	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1 µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* pour sensibiliser 0,1 ml de culot d'hématies qui seront utilisées en suspension à 1 p.100

Ces quantités d'antigène sont assez inférieures à celles qu'indiquent les expériences de CARTER (6) ; sans doute faut-il rechercher la raison de cette différence dans l'inégalité des degrés de purification.

La réaction d'héماغglutination passive permet de mettre en évidence, sans contestation possible, la non-identité antigénique des deux lipopolyosides spécifiques B et E (tableau n° IV).

n'est pas totale dans le cas de l'antisérum E pour une même masse d'antigène, ce qui peut s'expliquer soit par une faible réaction croisée, soit par une saturation incomplète des anticorps (il aurait fallu plus de 100 µg de lipopolyoside E).

Quoiqu'il en soit, les épreuves d'héماغglutination normale ou inhibée montrent qu'il existe un antigène spécifique du type B et un autre spécifique du type E.

Tableau N° III

Réaction d'héماغglutination passive avec le lipopolyoside purifié de type B (souche Insein)

Quantités de lipopolyoside *	Dilutions du sérum						
	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
50 µg	+	+	+	+	+	+	-
25 µg	+	+	+	+	+	+	-
10 µg	+	+	+	+	+	±	-
5 µg	+	+	+	+	+	±	-
2,5 µg	+	+	+	+	±	-	-
1 µg	+	+	±	-	-	-	-
0,5 µg	-	-	-	-	-	-	-

* pour sensibiliser 0,1 ml de culot d'hématies qui seront utilisées en suspension à 1 p.100

Il existe cependant une réaction croisée positive au 1/20 (sérum B sur antigène E), donc assez faible, que nous avons déjà signalée dans nos premières observations.

Le tableau n° V résume les expériences d'inhibition homologues ou croisées de l'héماغglutination ; on observe qu'avec 100 µg d'antigène

purifié on peut inhiber complètement l'activité de 0,4 ml d'antisérum B au 1/10. L'inhibition

b) *Diffusion-précipitation en milieu gélifié* :

Cette méthode révèle, de façon tout aussi nette, l'individualité du type E. Une ligne de précipitation très dense et brillante apparaît rapidement en milieu gélosé, lorsqu'un sérum

Tableau N° IV

Réactions d'héماغglutination croisée

1°) Hématies sensibilisées par le lipopolyoside B.											
Sérums	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Anti-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Anti-E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2°) Hématies sensibilisées par le lipopolyoside E.											
Anti-B	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tableau n° V

Réactions d'inhibition de l'hémagglutination

Sérums	Elément inhibiteur	Hématies O sensibilisées par	Dilutions des sérums et résultats :									
			1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
Anti-B	Sérum physiologique	Antigène B	4	4	4	4	4	4	4	4	2	0
	Lipopolyoside E 100 µg		4	4	4	4	4	4	4	3	0	0
	Lipopolyoside B 100 µg		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anti-E	Sérum physiologique	Antigène E	4	4	4	4	4	4	2	0	0	0
	Lipopolyoside B 100 µg		4	4	4	4	4	4	0	0	0	0
	Lipopolyoside E 100 µg		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

NB. : La réaction utilise les volumes suivants : - 0,4 ml de chaque dilution de sérum.
 - 0,1 ml de solution de lipopolyoside à 1 mg/ml, (soit 100 µg) ou de sérum physiologique.
 - 0,4 ml de suspension à 1 p.100 d'hématies sensibilisées.
 - Volume total par tube : 0,9 ml.

Les dilutions de sérum restent 2 heures à 37° en contact avec le lipopolyoside inhibiteur (ou le sérum physiologique) avant de recevoir la suspension d'hématies.

anti-E. est opposé au lipopolyoside E ; il s'agit là d'un phénomène spécifique. Aucune ligne n'apparaît lorsque ce même sérum est opposé aux lipopolyosides des types A et D (voir la fig. 6) ; par contre, une ligne floue, d'apparition très lente, décalée par rapport à l'arc spécifique E apparaît entre le réservoir du sérum anti-E et celui de l'antigène purifié de type B. Cette dernière ligne disparaît régulièrement lorsque ce sérum a été absorbé par des bactéries entières ou par le lipopolyoside de type B.

Il semble donc qu'un sérum anti-E possède à la fois des anticorps spécifiques E, en majeure partie, et des anticorps B en petite quantité ; ce serait là le reflet de la composition antigénique des lipopolyosides des bactéries de type E.

Ce serait aussi l'explication des réactions croisées aux basses dilutions de sérum dans les épreuves d'hémagglutination.

2. — *In vivo* :

Le lipopolyoside E injecté à doses répétées à des souris ne provoque, semble-t-il, l'élaboration d'aucun anticorps protecteur. Des souris qui ont reçu 6 injections sous-cutanées de 50 µg d'antigène du type B ou E ne sont aucunement protégées contre 1.000 doses sûrement mortelles de *Pasteurella multocida* type B ou E (épreuve homologue ou croisée), ainsi qu'en témoigne le tableau n° VI.

On pourrait en conclure que cet antigène n'a aucun rôle dans l'élaboration des anticorps protecteurs ; mais la méthode de WESTPHAL ne nous permet sans doute d'obtenir qu'un « haptène » et non l'antigène complet : haptène + protéine.

Nous avons essayé d'absorber un sérum anti-E par le lipopolyoside spécifique afin de voir si le pouvoir protecteur de ce sérum s'en trouvait modifié.

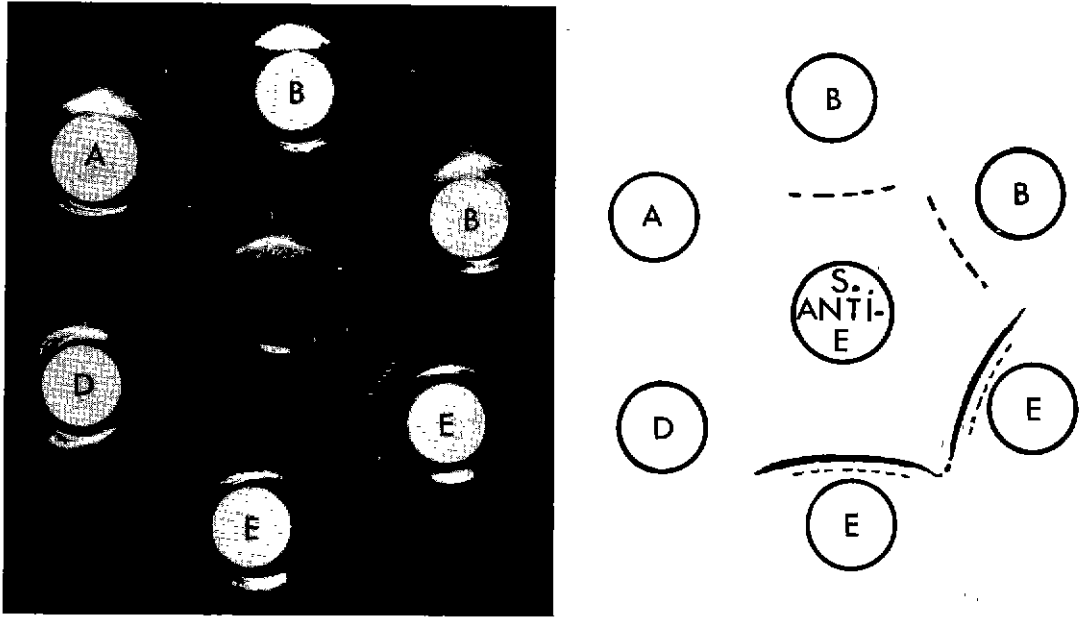


Fig. 6. — Précipitation en gélase : sérum anti-E (souche P_7) et lipopolysides des types A (souche 2077), B (souches Insein et 853), D (souche 1554) et E (souche P_{13}).

La photo montre l'arc spécifique du type E ; le schéma indique en outre, en trait pointillé, la ligne de précipitation caractéristique de la fraction lipopolysidique commune aux types B et E, non visible sur la photo.

En trois absorptions successives exécutées à la température de 4° , une quantité globale d'environ 10 mg de lipopolyside est nécessaire pour supprimer totalement l'activité agglutinante et précipitante de 4 ml d'un bon sérum anti-E (hémagglutination positive au 1/2560, protection de la souris à la dose de 0,05 ml contre au moins 10.000 D. S. M.).

Le pouvoir protecteur se trouve fortement réduit : 50 p. 100 des souris seulement survivent à une dose de 1.000 D. S. M. après avoir reçu 0,1 ml de ce sérum absorbé.

L'absorption des anticorps protecteurs n'est donc que partielle et il est vraisemblable que d'autres antigènes bactériens interviennent dans l'élaboration de l'immunité ; mais il est permis de penser que l'antigène lipopolysidique « complet » tel qu'il existe dans la bactérie, lié à des éléments protéiques, provoque la formation *in vivo* d'une partie au moins des anticorps protecteurs et peut donc se classer parmi les antigènes vaccinaux.

Adsorbé sur des hématies de mouton et injecté au lapin par voie intraveineuse (8 injections à 3 jours d'intervalle de 1 ml d'une suspension à 2 p. 100 d'hématies sensibilisées), ce lipopoly-

side provoque la formation d'agglutinines à un titre qui s'est élevé dans nos essais, jusqu'au 1/5120 (en hémagglutination passive) ; le sérum des lapins ainsi immunisés contient également des précipitines, mais à un titre beaucoup plus faible.

Il a aussi un pouvoir protecteur très net ; à la dose de 0,1 ml en injection sous-cutanée, il protège la souris contre 10.000 doses sûrement mortelles d'une souche de *Pasteurella multocida* de même type ; il s'agit donc bien d'un antigène vaccinant.

Cette protection est très spécifique et ne vaut que pour le sérotype E ; aucune souris ainsi protégée (0,1 ml de sérum injecté la veille de l'épreuve) ne résiste à une infection de 100 D. S. M. par le sérotype B*.

Ces résultats s'accordent très bien avec le parallélisme constamment observé dans l'espèce *Pasteurella multocida* entre la spécificité sérologique et la spécificité immunologique.

* Dans ces expériences, la dose sûrement mortelle pour la souris est de 0,1 ml à la dilution 10^{-8} d'une hémoculture de 6 heures, pour les souches B (Insein, 215 Roberts) et les souches E (P_7 , P_{13}).

Tableau n° VI

Essai d'immunisation de la souris par les lipopolyosides B et E.

Nombre de Souris	Quantités de lipopolyoside ou de sérum protecteur injectées	Nombre de souris survivantes	Epreuve: (souche et dose)	Résultats
15	Type B 6 injections de 50 µg à 3 jours d'intervalle	13		+++++ +++++ +++
15	Type E 6 injections de 50 µg à 3 jours d'intervalle	13	Souche P 7 (E) $0,1 \times 10^{-4}$ ml (1000 D S M)	+++++ +++++ +++
5	0,05 ml de sérum E (la veille de l'épreuve)	5		-----
15	Type B 6 injections de 50 µg à 3 jours d'intervalle	8		+++++ +++
15	Type E 6 injections de 50 µg à 3 jours d'intervalle	13	Souche Insein(B) $0,1 \times 10^{-4}$ ml (1000 D S M)	+++++ +++++ +++
5	0,05 ml de sérum B (la veille de l'épreuve)	5		-----

NB. La survie est indiquée par le signe - , la mort par le signe +

COMMENTAIRES

Sur le plan technique, il est difficile, même en opérant de façon rigoureusement identique, d'obtenir par la méthode de WESTPHAL des lots d'antigène strictement comparables en ce qui concerne d'une part leur composition chimique élémentaire, d'autre part leur activité sérologique qui, si elle reste qualitativement la même, varie souvent quantitativement de façon assez importante d'un lot à l'autre, et surtout si, sans changer de type sérologique, on change de souche.

Un fait est certain : le lot de lipopolyoside purifié qui s'est révélé le plus actif sérologiquement a été préparé avec une souche de *P. multocida* isolée un mois avant et n'ayant subi que deux subcultures ; nos autres souches, bien que

conservées avec beaucoup de précautions, nous ont donné des résultats satisfaisants mais nettement moins bons.

Nos observations, quant au pouvoir toxique de l'antigène purifié, concordent exactement avec celles de BAIN et KNOX (2) au sujet des lipopolyosides du type B ; nous avons constaté, à mesure que progressait notre technique de préparation et qu'étaient purifiés nos lots de lipopolyosides, que le pouvoir toxique semblait diminuer, en même temps que diminuait le pourcentage en azote. C'est la fraction lipidique qui, en principe, est responsable de la toxicité ; mais ne pourrait-il s'y ajouter le rôle toxique d'un autre élément (azoté ou protéique), lequel aurait existé dans nos préparations en tant d'impureté ?

Sur le plan sérologique, il n'est guère besoin

de commenter l'intérêt que l'on peut avoir à disposer d'un antigène purifié, extrêmement spécifique et titrable de manière très précise; il est sûr que l'immunologie des pasteurelloses et la sérotypie des souches en profiteront largement.

Il semble que l'on puisse admettre que le sérotype E de *Pasteurella multocida* est caractérisé par un groupement d'antigènes lipopolyosidiques comprenant, d'une part et en majeure partie, un antigène spécifique déterminant le type E, d'autre part et en faible quantité une fraction commune avec les lipopolyosides de type B.

Une structure antigénique parallèle se rencontrerait dans les lipopolyosides du type B : d'abord, la fraction spécifique B, ensuite la fraction commune, celle-ci beaucoup moins importante que la première; c'est ce qu'il semble ressortir de nos essais d'analyse en milieu gélifié, analyse que nous nous proposons de pousser plus à fond.

CONCLUSION

La méthode de WESTPHAL permet d'isoler de *Pasteurella multocida* type E un antigène lipopolyosidique ayant les propriétés générales des endotoxines des germes gram-négatifs.

Sa composition élémentaire, ses caractères de

toxicité et ses propriétés sérologiques sont absolument parallèles à ceux que présente le lipopolyoside du type B de *Pasteurella multocida*.

Mais les techniques sérologiques montrent que cet antigène est qualitativement différent de celui du type B; la réalité du type E africain s'en trouve donc confirmée, le type sérologique étant, d'une façon commune, déterminé chez les gram-négatifs par la nature des antigènes lipopolyosidiques.

Comme les lipopolyosides spécifiques des autres types de *Pasteurella multocida* l'endotoxine E est l'antigène responsable du phénomène de l'hémagglutination passive. Il possède, *in vivo*, un pouvoir antigénique certain; adsorbé sur des hématies injectées au lapin, il permet d'obtenir un sérum agglutinant, précipitant et protecteur pour la souris.

Il reste à approfondir, par voie analytique, les différences de composition chimique qui existent entre les lipopolyosides B et E et que révèle, pour le moment, la sérologie seule; c'est ce que nous nous proposons dans un travail ultérieur.

*Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire
des Pays tropicaux.*

*Laboratoires de microbiologie
et de chimie biologique d'Alfort.
Laboratoire de Farcha-Fort-Lamy.*

SUMMARY

Glycolipoid antigen of *P. multocida*. Type E.

A glycolipoid antigen has been isolated from *P. multocida* type E by Westphal's method. It has the general properties of endotoxins from gram-negative organisms.

Its elementary composition, toxic characters and serological properties are absolutely parallel to type B lipopolysaccharide of the same organism.

Serologic techniques show however that the type E antigen is qualitatively different to type B. The identity of a type E antigen of African origin is thus confirmed.

As with the specific glycolipoids of other types of *P. multocida*, endotoxin E is the antigen responsible for the phenomenon of passive haemagglutination. *In vivo* it has a definite antigenic property and when adsorbed to R. B. C. and injected into rabbits, it produces a serum which agglutinates and precipitates and protects mice.

For the time being only the serological differences are known between these two antigens, B and E, and it remains to detect by analysis the differential chemical compositions. This it is proposed to work on.

RESUMEN

Antígeno lipopoliosídico de *Pasteurella multocida*, tipo E

El método de Westphal permite asilar de « *Pasteurella multocida* » tipo E un antígeno lipopoliosídico que posee las propiedades generales de las endotoxinas de los gérmenes gram-negativos.

Su composición elemental, sus características de toxicidad y sus propiedades serológicas son absolutamente paralelas a aquellas que presenta el lipopoliosido del tipo B de « *Pasteurella multocida* ».

Pero, las técnicas serológicas demuestran que este antígeno es cualitativamente diferente de aquel del tipo B ; la realidad del tipo E africano se encuentra, pues, confirmada, ya que el tipo serológico queda, de forma general, determinado en el caso de los gram-negativos por el propio género de los antígenos lipopoliosídicos.

Como los lipopoliosídicos específicos de los demás tipos de « *Pasteurella multocida* », la endotoxina E constituye el antígeno responsable de la hemaglutinación pasiva y posee, *in vivo*, un poder antigénico indiscutible. En absorción sobre hematies inyectadas al conejo, permite obtener un suero aglutinante, precipitante y protector para el ratón.

Quedan aún por profundizar, por vía analítica, las diferencias de composición química que existen entre los lipopoliosidos B y E y que pone de manifiesto, por el momento, la serología únicamente. Esto es lo que nos proponemos realizar en un trabajo ulterior.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARDRY (R.). — Le dosage des protéines par la réaction du biuret, détermination d'un coefficient spécifique d'absorption. *Ann. Biol. clinique*, 1960, 18 (3-4) : 214-22.
2. BAIN (R. V. S.) et KNOX (K. W.). — The antigens of *Pasteurella multocida* type I. II. Lipopolysaccharides. *Immunology*, 1961, 4 (2) : 122-9.
3. CARTER (G. R.). — Studies on *Pasteurella multocida* I. A. haemagglutination test for the identification of serological types. *Amer. J. Vet. Res.*, 1955, 16 : 481-4.
4. CARTER (G. R.). — A new serological type of *Pasteurella multocida* from Central Africa. *Vet. Rec.*, 1961, 73 (42) : 1052.
5. CARTER (G. R.) et ANNAU (E.). — Isolation of capsular polysaccharides from colonial variants of *Pasteurella multocida*. *Amer. J. Vet. Res.*, 1953, 14 : 475-8.
6. CARTER (G. R.) et RAPPAY (D. E.). — A haemagglutination test employing specific lipopolysaccharides for the detection and measurement of *Pasteurella* antibodies to « *Pasteurella multocida* ». *Brit. Vet. J.*, 1963, 119 (2) : 73-7.
7. DELSAL (J. L.) et MANHOURI (H.). — Etude comparative des dosages colorimétriques du phosphore. Recherche d'une méthode de haute sensibilité applicable au dosage du phosphore organique dans les spots après chromatographie. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, 37 (9-10) : 1041-7.
8. GRABAR (P.) et BURTIN (P.). — Analyse immuno-électrophorétique. Ses applications aux liquides biologiques humains. 1960, Masson et Cie, éditeurs, Paris.
9. MAC LENNAN (A. P.) et RONDLE (C. J. M.). — *Pasteurella* septica : the occurrence of type specific polysaccharides containing aldohexose sugars. *Nature (London)*, 1957, 180 (4594) : 1045-6.
10. PERREAU (P.). — La culture dense de *Pasteurella multocida*, méthode de choix pour la production du vaccin contre la pasteurellose bovine. *Rev. Elev. méd. Vét. Pays trop.*, 1961, 14 (2) : 133-40.
11. PERREAU (P.). — Contribution à l'étude immunologique de *Pasteurella multocida*. Existence et importance d'un nouveau type, agent de la septicémie hémorragique des bovidés africains. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1961, 14 (3) : 245-56.
12. PIROSKY (I.). — Sur l'antigène glucido-lipidique des *Pasteurella*. *Compt. rend. Soc. de Biol.*, 1938, 127 : 98-100.

13. PIROSKY (I.). — Sur l'existence, chez les variants *Smooth* et *Rough* d'une souche de *Pasteurella aviseptica*, de deux antigènes glucido-lipidiques sérologiquement distincts. *Compt. rend. Soc de Biol.*, 1938, **128** : 346-7.
14. PIROSKY (I.). — Sur les propriétés immunisantes, antitoxiques et anti-infectieuses de l'antigène glucido-lipidique de « *Pasteurella aviseptica* ». *Compt. rend. Soc. de Biol.*, 1938, **127** : 966-9.
15. SCHEIDEGGER (J. J.). — *Inter. Ach. Allergy Appl. Immunol.*, 1955, **7** : 103.
16. STAMATIN (N.), SERBANESCU (C.) et VLADLEANU (M.). — L'activité pathogène de la toxine des *Pasteurella* pour quelques espèces animales. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76** : 84.
17. URIEL (J.) et GRABAR (P.). — Emploi de colorants dans l'analyse immunoélectrophorétique en milieu gélifié. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90** (4) : 427-40.
18. WESTPHAL (O.). — *Pyrogens. Polysaccharides in biology*. 1957, p. 115-220, édité par Josiah Macy Jr. Foundation, New-York, N. Y.
19. WESTPHAL (O.). — Récentes recherches sur la chimie et la biologie des endotoxines des bactéries à gram-négatif. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98** (6) : 789-813.